

11. Bezpečnost' potravin, GMO, klonovanie zvierat

Dobrý den. V přednášce se zaměříme na základy bezpečnosti potravin především ve spojení s GMO a popíšeme podstatu a význam GMO a klonování zvířat.

Bezpečnost potravin je v současnosti jedno z nejdůležitějších témat ve spojení s chovem zvířat a produkcí potravin. Z tohoto hlediska je nutné sledovat potenciální výskyt škodlivých chemických látek, které mohou mít mutagenní či dokonce kancerogenní povahu. Zde se nejčastěji můžeme setkat s výskytem těžkých kovů a mykotoxinů. V některých zemích se v mase mohou vyskytovat i antibiotika jako nežádoucí kontaminace. Potraviny musí mít definované složení, aby se předešlo výskytu přirozeně se vyskytujících alergenů, a v tomto případě je nutné na toto riziko konzumenty upozornit. Nejzávažnější z hlediska zdravotního je mikrobiologická kontaminace, především u masa a mléčných výrobků bakteriemi jako jsou např. salmonelóza, listerióza či kampylobakterií. Naštěstí je možné výskyt těchto alimentárních patogenů testovat mikrobiologickými kultivačními technikami, ale i pomocí DNA testů. Ve spojení s výskytem GMO v potravinách se provádí při jejich schvalování důkladné testování jejich zdravotní nezávadnosti. U GMO je potenciální riziko výskytu alergenů, proto i tyto je třeba testovat a detekovat. Podobné mechanismy ověřování zdravotní nezávadnosti je třeba aplikovat i u potenciálních potravin vyrobených z klonovaných zvířat.

V současnosti musí být u potravin s obsahem GMO nad 0,9% deklarována jejich přítomnost. Za tímto účelem bylo vyvinuto několik citlivých detekčních metod. Diagnostiku GMO v potravinách můžeme provést pomocí důkazu přítomnosti GMO a to přímou metodou identifikace transgenní DNA (pomocí polymerázové řetězové reakce - PCR) nebo prokázání transgenní bílkoviny – imunochemicky metodou ELISA. V případě použití PCR je-li přítomen ve vzorku DNA transgen, dochází k namnožení, neboli amplifikaci produktu, který je viditelný jako proužek na elektroforetickém gelu.

K určení podílu GMO v potravinách slouží tzv. kvantitativní metody. Nejcitlivější metodou je PCR v reálném čase, která je extrémně přesná a citlivá. Množství GMO ve vzorku se stanoví na základě porovnání křivky zkoumaného vzorku s křivkami standardů o známém složení. Metoda se též nazývá relativní kvantifikace.

Z hlediska výsledku není rozdíl mezi tradičním šlechtěním a transgenozí, jako hlavní metodou tvorby geneticky modifikovaných organismů. Mají totiž stejný cíl, a to získat jedince s žádanými alelami ve svých genotypech. Při tradičním šlechtění se používá často hybridizace a záměrné připařování a je třeba mnoha generací než získáme žádanou kombinaci genotypů. Transgenozí charakterizuje cílená a rychlá změna, přičemž je nutná znalost genu, který chceme použít a pomocí vektoru ho přenést do organismu, tzn. jeho struktury, funkce a sekvence. V tradičním šlechtění jde o práci v populaci, při transgenozí můžeme hovořit o šlechtění jedince. Na schématu vidíme srovnání obou přístupů.

Nejdříve si definujme genetickou modifikaci. Genetické modifikace jsou cílené zásahy do genetické informace. I když výsledek může být podobný, tak náhodné zásahy působením mutagenů nebo ionizujícího záření (tvorba odrůd pšenice, řepky...) **nej**sou považovány za genetickou modifikaci. Mezi genetické modifikace patří záměrné změny aktivity genů, změny „místa působení“ (v jaké tkáni), záměna genu za jinou variantu, vyblokování genů a zejména pak vnášení cizích genů – transgenoze. Klasickým příkladem transgenoze je u rostlin využívání

bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která má přirozenou schopnost vnášet geny např. pro odolnosti k herbicidům nebo pro produkci insekticidů – takto vznikla např. Bt-kukuřice. Současně s rozvojem těchto biotechnologií vychází zákonné regulace, jako např. zákon o nakládání s GMO.

Genetické modifikace jsou synonymem pro techniky rekombinantní DNA. Jedná se o přímé a cílené zásahy do dědičného materiálu organismu (tzn. do DNA). Nejznámější metodou je transgenóza, neboli přenos genu mezi druhy a vnášení jednotlivých genů do genomu metodami genetického inženýrství. Geneticky modifikovaný organismus (GM organismus, GMO) je organismus (kromě člověka), jehož genetický materiál byl úmyslně změněn, a to způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací. GMO mohou být mikroorganismy, houby, rostliny nebo živočichové.

Při tvorbě GMO vzniká řada problémů. Jedním z nich je nízká účinnost vkládání inzertů. Začlenění inzertu a jeho kopií probíhá často náhodně. Produkt se může tvořit v nízké nebo vysoké koncentraci, protože je obtížné správně regulovat vyjádření, tj. expresi daného strukturního genu. Začlenění cizí DNA je často nestabilní a ve sledu generací se může vytratit. Genové manipulace jsou stále nákladné a cíl bývá dosažen s velkou nejistotou. Nejmodernější molekulární biotechnologie založené na systému CRISPR-CAS9 většinu těchto problémů pomáhají řešit.

Podstatou procesu technologie rekombinantní DNA (využívaného v genetickém inženýrství) je využívání restrikčních enzymů, které pochází z bakterií a slouží jako obranný mechanismus proti cizorodé DNA, a které dokážou štěpit DNA ve specifickém místě označovaném jako restrikční místo. Použitím stejného enzymu pro otevření vektoru i tvorbu obou konců genu lze zvýšit pravděpodobnost správného vložení genu do plazmidu, k tomuto spojení se využívá enzym DNA - ligáza. Tento proces spojování původně nesourodých úseků DNA nazýváme rekombinace DNA. Vektor se pak může začlenit do genomu hostitelské buňky a tím se přeneše i vlastní sekvence genu.

Základním problémem při transgenózi je, jak účinně vpravit rekombinantní DNA do buňky a jádra. Je vyvinuto mnoho metod, z nichž nejprve uvádím tzv. biologické metody. Lipofekce probíhá s pomocí lipidových micel, které enkapsulují nukleové kyseliny do lipozomů - a ty se mohou přirozeně dostat až do jádra buňky. Transfekce pomocí plazmidových vektorů je poměrně jednoduchá metoda, ale s nízkým účinkem. U zvířat se dnes využívá častěji virových vektorů, které mají přirozenou schopnost průniku do buňky a jádra. V případě adenovirů DNA proniká do chromatinu, nikoliv přímo do DNA, v případě retrovirů a lentivirů se pak cizorodá DNA integruje přímo do genomu. Na obrázku vpravo vidíme schéma lentiviru, který kromě RNA obsahuje enzymy pro integraci nukleové kyseliny do DNA hostitele. Při transgenózi se dbá na to, aby virové vektory byly bezpečné, jsou upraveny tak, aby nebyly schopné reprodukce v hostitelské buňce.

Fyzikální metody zahrnují především mikroinjekci, tj. vnesení DNA do oplozeného vajíčka nebo do embryonálních kmenových buněk, metoda je to nenáročná a cizí geny se exprimují účinně. Metodu nelze využít v pozdějším vývojovém stádiu, nevýhodou je nízká úspěšnost a náhodné začleňování inzertu. Přenos genů pomocí embryonálních kmenových buněk tzv. ESC je specializovaná metoda, kdy pluripotentní buňky blastocysty s in vitro vloženou DNA se vkládají do cizího embrya a to pak do dělohy náhradní matky. Výsledkem je narození mláďete, které je genetickou chimérou, tzn. některé tkáně má s transgenem a jiné nikoliv.

Dalšími metodami je přenos DNA přes různé částice a jejich nastřelování do buňky, dále elektroporace (tj. tvorba pórů v buňce pomocí elektrických impulzů). Lze též využít tepelného šoku nebo obalených magnetických částic. Všechny tyto metody mají ale relativně nízkou účinnost (do 5 %) a jejich použití záleží na konkrétním druhu zvířat a zkušenostech příslušné laboratoře.

Na tomto schématu vidíme příklad techniky mikroinjekce, kterou se přenáší transgen, s cílem, aby se po začlenění transgen exprimoval jen v mléčné žláze a produkt, tzn. protein byl tak snadno izolovatelný z transgenního mléka. Takto upravená zvířata sloužící k produkci specifických transgenních proteinů nazýváme jako biofermentory.

Různé způsoby využití mikroinjektáže vidíme na obrázcích zde. Může se použít injektáž do prvojádra těsně před splynutím jader a vznikem zygoty -výsledkem je kompletně transgenní jedinec. Dalším přístupem je vkládání transgenů do embryonálních kmenových buněk a těch pak do hostitelské blastocysty. Narodí se chiméry, které dále navzájem křížíme a v dalších generacích může být získán opět kompletně transgenní jedinec. Výhodou této metody je to, že můžeme embryonální kmenové buňky kultivovat a selektovat, což zvyšuje pravděpodobnost úspěchu při transgenozí. Další často využívanou metodou je přenos jádra, kdy se DNA konstrukt vloží do kultivovaných somatických buněk (většinou málo diferencovaných, např. fibroblastů), a poté se z nich odebere jádro, které se následně vloží do enukleovaného vajíčka. Zygota je pak implantována do náhradní matky a může se narodit opět jedinec transgenní ve všech buňkách.

A k čemu je vlastně tvorba GM zvířat dobrá? Nejvýznamnější využití geneticky modifikovaných zvířat vidím v oblasti farmaceutické výroby. Řada velmi důležitých léčiv, často pro léčbu dědičných onemocnění je proteinové povahy. Proteiny jako složité látky nelze vyrábět chemickou výrobou, jako jednoduchá léčiva, ale musí docházet k syntéze v biologických systémech. Nejjednodušší je výroba léčiv pomocí mikroorganismů, např. bakterií. Takto se již řadu let vyrábí inzulin. Inzulin je ale poměrně jednoduchý protein a ty složitější, se specifickými posttranslačními modifikacemi bakterie vyrábět neumí. Nezbyvá než využít eukaryota – a to zvířata jako savce nebo ptáky. Jedním z mnoha příkladů výroby léčiva je získání lidského proteinu sebelipáza alfa z vajec kura domácího. Ze savců se často k podobnému účelu využívají kozy nebo králíci.

Proteiny mají velmi rozmanité vlastnosti, které se dají využívat i jako materiály pro různé rozvinuté technologie. Např. pavoučí protein je látka v poměru k objemu a hmotnosti asi 7x pevnější než kvalitní ocel a označuje se jako Biosteel. Zdrojem jsou geneticky modifikované kozy tvořící tento protein ve svém mléce.

Příkladů GM potravin živočišného původu schválené ke konzumaci není mnoho. Známým příkladem je GM losos, který roste 11x rychleji než běžně chovaný losos obecný. Schvalovací řízení ve spojených státech amerických bylo velmi komplikované a trvalo celých 20 let. Aby nedošlo k úniku GM lososů do přírody dochází k chovu v izolovaných kádích.

S transgenozí jsou spojeny také etické problémy. Je nový produkt akceptovatelný pro zákazníky? Spotřebitelé v Evropě spíše nechtějí potraviny z GMO. V minulosti v souvislosti s prvními nezdařenými experimenty vznikla obava, zda existuje riziko vzniku tumorů nebo neurodegenerativních onemocnění u transgenních zvířat v důsledku integrace nebo exprese transgenů. Je logické, že postranní efekty v důsledku modifikujících genů nelze vždy vyloučit.

Etickým problémem pro řadu lidí může být i to, že lidé mohou mít benefity z transgenních zvířat, ačkoliv transgenní zvířata sama je nemají. Každopádně je třeba zaručit, že GM nezpůsobuje zvířatům žádné újmy. Časté jsou obavy, že cizí geny ovlivňují hostitele a zda nemůže vzniknout ohrožení pro ekologickou rovnováhu a diverzitu druhů. Chov GM zvířat je ale obvykle uzavřený, nicméně 100% záruka neexistuje. V současné době rychle se rozvíjející editace genomu jako metody způsobující specifické a jen malé změny v genomu většinu potenciálních rizik eliminuje. V každém případě ale veškeré GMO podléhají detailnímu ověření potenciálních rizik, bezpečnost by tedy měla být zaručena.

A nyní několik slov ke klonování zvířat. Klonování v tomto slova smyslu je reprodukční technika pro tvorbu geneticky identických potomků. Často se však využívá i pro techniky spojené s genetickou modifikací. Mezi techniky klonování u savců patří mikrochirurgická disekce embrya, izolace a proliferace nebo agregace jednotlivých blastomer a především přenos jádra, které může ale nemusí být modifikováno. Klonování u savců můžeme rozdělit na reprodukční, kdy dochází k tvorbě nového geneticky identického jedince a terapeutické za účelem léčby. První typ se týká výhradně zvířat, druhý naopak má velký potenciál v humánní medicíně.

První úspěšné klonování savce z dospělé buňky realizoval prof. Wilmuta z Roslinského Institutu ve Skotsku, kdy se již v roce 1996 narodila ovečka Dolly. Byla použita technika přenosu jádra fúzí buněk. Dolly byla geneticky identická s ovcí, z které bylo odebráno jádro ze somatické buňky epitelu mléčné žlázy. Zajímavostí je, že ovečka Dolly měla 3 matky: první darovala genetickou informaci, druhá prázdné vajíčko a třetí donosila mládě.

Ve spojení s klonováním savců se objevila řada problémů. U řady zvířat se objevilo nízké procento zabřezávání, vývojové vady – rané zmetání, narození mrtvých potomků, časná úmrtí po narození, krátká životnost, obezita, malformace různých orgánů a špatná imunita. Obecně panuje nepřijetí klonovaných zvířat chovateli – např. koně nejsou zařazováni do plemenných knih. Vznikají legislativní a etické problémy. Co se týče potravinových produktů z klonovaných zvířat (neboli „klonované maso“) – podle amerického úřadu pro kontrolu potravin a léčiv FDA je bez rizika konzumovat maso klonovaných zvířat. Ekonomicky je však tento chov vzhledem k vysokým nákladům na klonování zatím vysoce neefektivní. Evropský úřad pro bezpečnost potravin ESFA také prohlásil produkty živočišného původu z klonů za bezpečné, problém je s welfare příjemky a vlastních klonů.

Dosud bylo naklonováno velké množství různých živočišných druhů, od modelových, jako myš a potkan, po většinu hospodářských zvířat. Na obrázku je 6 klonů jedné klisny, na kterých majitel jezdil během koňského póla. Na obrázku je zajímavé to, že i když klisny jsou vysoce podobné, nejsou z hlediska zbarvení identické. Rozmístění a velikost barevných znaků v tomto případě není jednoznačně geneticky dané. Dá se říci, že často se ve světě klonuje za peníze a pro zábavu či zviditelnění.

Hlavní význam klonovacích technik vidím především v potenciálu pro tzv. terapeutické klonování, které by mohlo umožnit léčbu dosud neléčitelných onemocnění. Mechanismem této léčby je nahrazení poškozených buněk buňkami geneticky identickými buňkám vlastního těla, případně s opravenou genetickou informací (v případě léčby genetických onemocnění). Jako slibné se jeví využití embryonálních kmenových buněk a především indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC) vytvořených přímo ze somatických buněk konkrétního pacienta.

Na rozdíl od potravin z GMO jsou potraviny z klonovaných zvířat přijatelnější, neobsahují nic cizorodého. Oba biotechnologické přístupy však vyžadují zlepšení postupů zejména s ohledem na welfare života takto vytvořených zvířat. Spotřebitel, ale ani dokonalý laboratorní analyzátor rozdíl mezi těmito kusy nepozná.

Problematika GMO a klonování zvířat patří ke kontroverzním tématům a názor na tyto techniky si musí udělat každý posluchač sám. Snahou této krátké prezentace bylo přinést objektivní informace, které by pomohly tento názor vytvořit. Děkuji všem za pozornost

A děkuji vám za pozornost.